

## <講演抄録>3.Multplex-PCRによる歯周病関連細菌の迅速同定

著者	佐藤 拓一, 宮澤 はるみ, 高橋 信博
雑誌名	東北大学歯学雑誌
巻	19
号	1
ページ	81-81
発行年	2000-06
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/31711">http://hdl.handle.net/10097/31711</a>

### 3. Multiplex-PCR による歯周病関連細菌の迅速同定

佐藤拓一<sup>1</sup>, 宮澤はるみ<sup>2</sup>, 高橋信博<sup>1</sup> (東北大学歯学部口腔化学講座<sup>1</sup>, 小児歯科学講座<sup>2</sup>)

歯周ポケットには数百種類の細菌種が棲みついでおり, その中で, 病原因子を持つ歯周病関連細菌の種類と量が, 歯周病の病態及び進行に深い関係があるとされている。しかし, 培養を中心とした口腔領域からの細菌の分析は, 一般に過程が煩雑で時間と労力がかかるのが現状である。そこで, 培養に代わる簡便で, 迅速な, 臨床細菌分析方法の確立を図るため, PCR による歯周病関連細菌の検出を試みた。歯周病関連細菌といわれる *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa), *Porphyromonas gingivalis* (Pg), *Treponema denticola* (Td) の培養菌株 (各々 Y4 株, ATCC 33277, ATCC 33520) から DNA を抽出し, その 16S ribosomal RNA 遺伝子を, 細菌種特異的 primers を用いて PCR で増幅した。さらに迅速性を図るため, multiplex-PCR による検出を試みた。その結果, 種特異的な 3 種類の primers を混在させた multiplex-PCR によって, Aa-, Pg-, Td-特異的な PCR 産物 (各々 273, 518, 945 bp) が得られた。また, 8 名の成人性歯周炎患者の歯周ポケット試料からも同様な結果が得られたことから, 16S rRNA 遺伝子をターゲットとした multiplex-PCR は, 多種類の歯周病関連細菌を迅速に検出・同定できる方法であると考えられ, 歯周病のリスク診断の一助となる可能性を持っていると考えられる。

### 4. 智歯の予後に関する診断学的研究

栗原直之, 飯久保正弘, 吉田篤史, 庄司憲明, 佐藤しづ子, 笹野高嗣 (東北大学歯学部口腔診断・放射線学講座)

「口腔単位」の歯科治療を行ううえで症状のない智歯の抜歯については統一見解が得られていないのが現状である。今回我々は智歯抜歯の診断基準を確立するための基礎的データを得ることを目的に調査を行った。

調査対象は, 昭和 48 年から平成元年までの本学部卒業生 790 名で, 臨床実習において撮影された口内法 X 線写真をもとに, 撮影当時, 智歯を有した 638 名にアンケートを送付し, 智歯の予備について調査した。回収された 308 名の智歯 (上顎 397 本, 下顎 426 本) について, ① これまでの症状の有無とその原因, ② 症状の発現時期, ③ X 線写真での, 萌出方向および

萌出程度と症状発現との関連性について検討した。その結果, ① 症状の発現は上顎に比べ, 下顎に多く, 原因は智歯周囲炎は下顎に, 齲蝕は上顎に多くみられた。② 40 歳までに症状が発現しない場合には, その後に症状が発現する危険性は少なかった。③ 萌出方向および萌出程度と症状発現に関連性はなかった。

### 5. 歯肉線維芽細胞のサイトカイン分泌能におよぼす薬物刺激効果

米田栄吉, 堀内 博 (東北大学歯学部歯科保存学第一講座)

キーワード: 歯肉線維芽細胞, サイトカイン, 歯肉増殖惹起薬物

目的: 歯肉線維芽細胞はある種の菌体, 菌体成分, IL-1 などによって炎症に関与するサイトカインの分泌が刺激されることが知られている。本研究の目的は正常・炎症・歯周病や増殖歯肉の線維芽細胞からのサイトカイン分泌能および, LPS や歯肉増殖症を惹起する薬物により分泌能が刺激されるかを検討することである。

材料と方法

歯肉採取ドナー: 1) 非炎症性正常歯肉 (26 歳男性, 埋伏歯周囲歯肉) 2) 炎症歯肉 (33 歳女性, 歯根破折部の歯肉) 3) PD>4 mm の歯周病歯肉 (47 歳女性) 4) Nifedipine 性増殖歯肉 (著しい炎症を伴う, 55 歳女性) 5) PHT 性増殖歯肉 (非炎症, 30 歳女性) 以上の 5 名の患者から同意を得て, 歯科処置時に歯肉を採取した。

上記の採取歯肉を 10% PCS 加 MEM 中, 5% CO<sub>2</sub> 下で培養し, 4-6 継代培養した線維芽細胞を実験に供した。10<sup>5</sup> ケ/ ml の細胞浮遊液を 1% MEM 培地で調製し, 24-well プレートに細胞浮遊液を 1 ml ずつ入れ, 約 3 日間 confluent になるまで培養した。

薬物刺激: 1) E. coli LPS 0.1 μg/ml, 2) Phenytoin 10 μM, 3) Nifedipine 10 μM, 4) Cyclosporine A 1 μM, 5) b-FGF 0.1 μg/ml の濃度になるように 1% FCS 加 MEM で調製した。Confluent に達した各 well の培養液を 1-5) の薬物培養液 1 ml で交換した。24 時間 incubate し, 各 well の培養上清を測定試料とした。Control は薬物を加えず, 1% FCS 加 MEM のみとした。

サイトカイン測定: 測定用試料中の下記のサイトカイン量を ELISA キットで測定した。1) IL-1β (Endogen), 2) IL-6 (Endogen), 3) IL-8 (Endogen), 4) TGF-β (Biotrak)